HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	葉緑体ゲノム
Author(s)	黒田, 洋詩
Citation	
Issue Date	2009-03-31
DOI	
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/39204
Right	
Type	bulletin (article)
Additional Information	
File Information	67-088.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

6．タバコ
b．葉緑体ゲノム

黒田　洋詩[1)]

葉緑体形質転換は，葉緑体遺伝子発現機構や遺伝子産物の機能解析などの基礎研究から有用タンパク質の生産などの応用研究まで広く利用されている．本章では，パーティクルデリバリー法によるタバコ葉緑体形質転換法を紹介する．

Biolistic method of tobacco plastid transformation

Hiroshi Kuroda

Plastids of plants carry their own genomes and gene expression system.　Plastid transformation is a powerful tool to study gene expression system and functions of gene products encoded in plastid genomes.　This chapter describes a biolistic method to obtain tobacco plants that carry stably transformed plastid genomes.

6.b.1　はじめに

光合成の場として知られる葉緑体は，プロプラスチドから分化した色素体の一形態であり，そこでは光エネルギーを化学エネルギーへと変換する反応だけでなく，色素合成，アミノ酸生合成など様々な反応が行われている[1)]．単細胞緑藻などとは異なり，多細胞の植物には異なる組織・器官があり，そこには機能的に分化した色素体が存在する．現在のシアノバクテリアと同じ祖先から進化したとされる色素体は，独自のゲノムとその発現系を持つ．タバコの場合，色素体ゲノムは約 156 kb の環状 DNA であり，そこには約 120 遺伝子がコードされている（図 1）[2,3)]．このうち，約 80 種類がタンパク質をコードする遺伝子であるが，いくつかの遺伝子産物の機能は長い間不明であった．クラミドモナスとタバコを材料にした葉緑体形質転換法による解析が行われるようになり，機能不明な遺伝子は残りわずかになってきた．また，葉緑体遺伝子発現機構の解析などの基礎研究から，ワクチンなどの医学的に重要なリコンビナント・タンパク質の生産，除草剤や害虫などに抵抗性をもつ植物の作出などの応用研究まで非常に幅広くこの技術が利用されている．本章ではまず，葉緑体形質転換法を用いてこれまでに行われた研究について簡単に触れ，続いて実際のプロトコールを紹介する．

1）名古屋市立大学大学院システム自然科学研究科

6.b.2　葉緑体形質転換法の確立

1986 年にタバコとゼニゴケで葉緑体ゲノムの全塩基配列が発表された[2,4)]．これにより，多くの機能不明の遺伝子や ORF が葉緑体ゲノムに含まれていることが明らかになり，それらの機能や遺伝子発現系の解析が葉緑体機能を探る上で重要な課題となった．一方，緑葉に存在するタンパク質の 50%以上が葉緑体に局在すること，ま

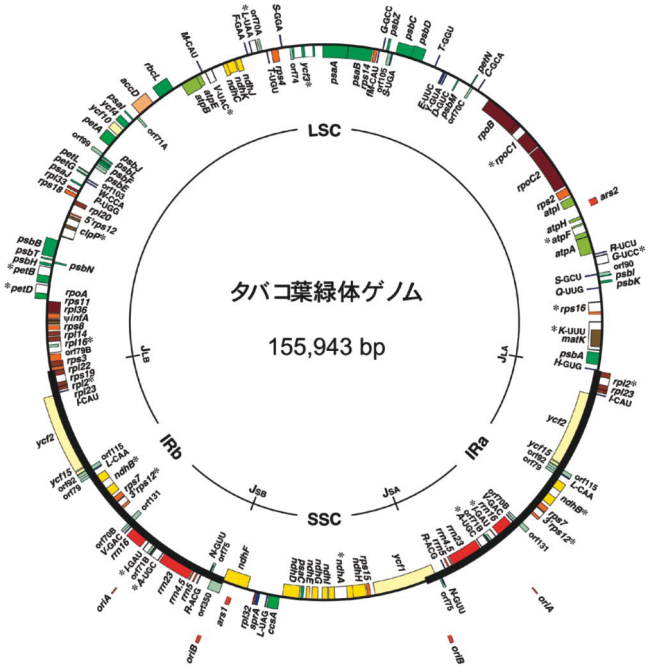

図 1：葉緑体ゲノム地図（2005 年版）[3)]．名古屋市立大学の湯川真希，杉浦昌弘両氏および愛知学院大学の續伯彦氏のご好意により提供していただいた図を改変した．

た，例えばタバコでは 1 細胞あたり約 10,000 コピーの葉緑体 DNA が存在することから，葉緑体ゲノムへ外来遺伝子を導入できれば，高レベルの組換えタンパク質の生産が可能になると考えられた．そのため，多くの研究者が様々な植物の葉緑体ゲノムの形質転換を目指して，研究を行った．

Boynton らは単細胞の緑藻クラミドモナスを用いて，相同組換えによる葉緑体ゲノムへ外来遺伝子を導入することに世界で初めて成功した[5]．クラミドモナスは細胞中に約 80 コピーの DNA をもつ葉緑体を一つしかもたないため，葉緑体形質転換の材料として適した生物であった．彼らは，葉緑体 ATP 合成酵素の β サブユニットをコードする *atpB* 遺伝子が部分的に欠損するために光独立栄養的に生育できない変異株をホストとして形質転換を行った．その結果，相同組換えにより正常な *atpB* 遺伝子が導入され，光独立栄養的に生育できる形質転換体を得ることができた．この方法では形質転換できるゲノム上の領域が限定されたが，1991 年に，Goldschmidt-Clermont により，抗生物質であるスペクチノマイシンに耐性を与える *aadA* 遺伝子を用いたクラミドモナス葉緑体形質転換法が発表され，葉緑体ゲノム上の任意の位置へレポーター遺伝子を導入したり，特定の遺伝子をノックアウトすることが可能となった[6]．

一方，多細胞の被子植物の葉緑体では，導入したレポーター遺伝子の一過的な発現は確認されていたが，安定な葉緑体形質転換体をなかなか得ることができなかった[7,8]．単細胞で葉緑体を一つしかもたないクラミドモナスと比べ，タバコを例にとると，細胞一つだけをみても約 100 コピーのゲノムをもつ葉緑体が約 100 個存在する[9]．つまり，1 細胞当たり葉緑体ゲノム約 10,000 コピーのすべてが均一に形質転換されなければならない高等植物では，葉緑体ゲノムすべてが形質転換した個体を得ることは非常に困難であることが予想されていた．そのような状況の中で，Svab らは抗生物質スペクチノマイシンとストレプトマイシンに耐性を与える変異を導入した *rrn16* を選択マーカーとして用い，タバコの葉緑体形質転換に高等植物で初めて成功した[10]．彼らはストレプトマイシン存在下で耐性株を選抜した後，ストレプトマイシン耐性を調べることで，組織培養の際に頻繁に出現するスペクチノマイシン耐性突然変異株と形質転換体を明確に区別した．1993 年には，クラミドモナス葉緑体形質転換で用いられた *aadA* 遺伝子を用いたタバコ葉緑体形質転換が報告され[11]，これ以降，タバコだけでなく，トマト[12]，ナタネ[13]，ニンジン[14]，ダイズ[15]，レタス[16]，ニンジン[14]，ポプラ[17]，コットン[18] などで葉緑体形質転換の成功が報告されている．葉緑体形質転換法により行われた研究についてまとめた非常に詳しい文献があるので，興味がある方は参照されたし[19]．

6.b.3　葉緑体形質転換法を利用した研究

図 2 は葉緑体ゲノムの形質転換を模式的に示したものである．葉緑体ゲノム（cpDNA）と形質転換ベクター（vector）上のターゲット領域間で相同組換えが起こり，選択マーカー遺伝子を含む領域が葉緑体ゲノムへ導入される（tp-cpDNA）．タバコ葉緑体形質転換では，図 2 A，2 B に示した外来遺伝子の導入と葉緑体遺伝子のノックアウトが主に行われており，図 2 C の葉緑体遺伝子の改変はタバコではあまり行われていない．

形質転換ベクターが葉緑体中へ導入されると，葉緑体 DNA とベクターDNA 間で組換えが起こり，まず少数の葉緑体 DNA が組換わる．最初のうちは一部の葉緑体

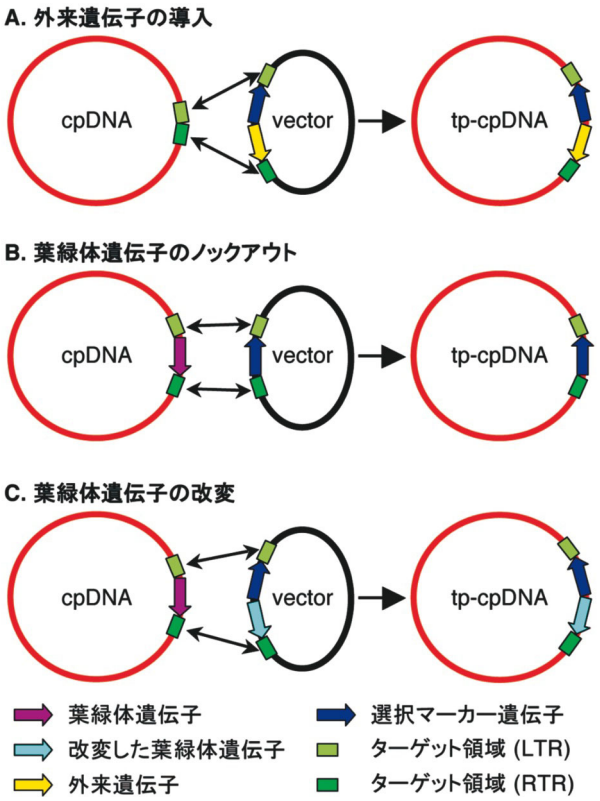

図 2：相同組換えによる葉緑体ゲノムの形質転換．A. 外来遺伝子の導入．B. 特定の葉緑体遺伝子のノックアウト．C. 葉緑体遺伝子の改変．葉緑体 DNA（cpDNA）とベクター（vector）上の葉緑体 DNA 配列との間で相同組換えが起こり，ターゲット領域に挟まれた領域が置換した葉緑体 DNA（tp-cpDNA）が生ずる．LTR, Left Targeting Region; RTR, Right Targeting Region; cpDNA, chloroplast DNA; tp-cpDNA, transplastomic chloroplast DNA.

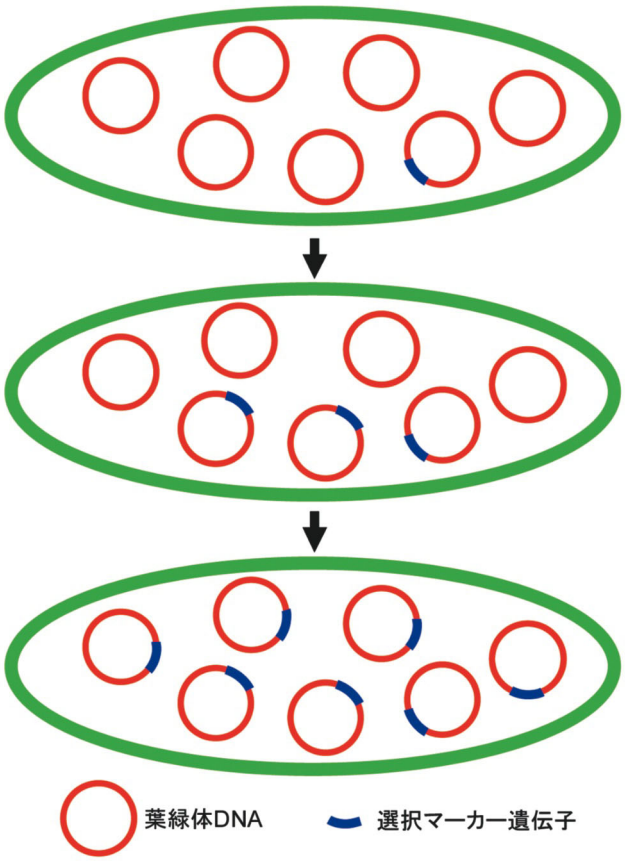

図3：形質転換した葉緑体ゲノムが徐々に増えて行く様子を模式的に示した図．選択圧のかかった状態で相同組換えと分裂を繰り返すことで，マーカー遺伝子を含む葉緑体が増えて行く．最終的に，葉緑体ゲノムがすべて置き換わったホモプラストミックな葉緑体形質転換体を得ることができる．

DNA コピーだけが置き換わったヘテロプラストミックな状態だが，選択培地で培養を続けるうちに組換え配列を含む葉緑体 DNA が増えて行き，最終的にすべての葉緑体 DNA が置き換わったホモプラストミックな状態になる（図 3）．一旦ホモプラストミックな状態になれば，選択圧をかけない状態にしても形質転換された葉緑体は安定に保持される．

6.b.3.1　遺伝子発現の解析および外来遺伝子の発現

先の述べたように，葉緑体には独自のゲノムと遺伝子発現系がある．光化学系などの動的な分子構築や修復には，高度に制御された遺伝子発現系が重要な役割を果たしており，多くの研究者が単離葉緑体や無細胞系を用いて解析を行っていた．葉緑体形質転換法が確立されると，レポーター遺伝子を用いて遺伝子発現制御に関わるゲノム配列（シス制御配列）の解析が行われるようになった[19]．

最初に調べられたのは，光化学系 II 反応中心タンパク質 D1 をコードする *psbA* 遺伝子の発現制御機構で，Staub らは，*psbA* 遺伝子のプロモーターと 5' 非翻訳領域をつないだ *uidA* レポーター遺伝子を葉緑体ゲノムへ導入し，光に依存した D1 タンパク質の合成が翻訳開始の段階で 5' 非翻訳領域を介して行われると報告した[20,21]．また，転写に関しては，青色光依存型の *psbD* プロモーター[22]，Type II NEP の *clpP1* プロモーター[23]，構成的な *rrn16* プロモーター[24] の解析が行われた．このうち，*rrn16* プロモーターについては唯一 *in vitro* 転写系でも非常に詳細な解析が行われた[24]．

このほか，RNA プロセシング（*psbT-psbH*，*psbH-petB*）[25]，スプライシング（*atpI*）[26]，RNA エディティング（*psbL*，*ndhB*）[27–32]，RNA の安定性（*rbcL*）[33]，翻訳（*atpB*，*rbcL*，*psbA*）[34–36] に関わるシス配列の研究が行われた．このうち，RNA エディティングはクラミドモナス葉緑体では起こらないため，*in vivo* でシス配列の解析を行うにはタバコを用いるしかなかった[37]．

遺伝子発現系についての研究により得られた情報は，葉緑体において外来遺伝子を高発現させる研究に応用されている[19,38–40]．ワクチンなどの医学的に有用なタンパク質，生分解性プラスチックのような工業的に有用なタンパク質，除草剤や害虫に耐性を与える農業的に有用なタンパク質がその対象となっており，最近では，葉緑体における代謝系の改変なども行われている[19]．

6.b.3.2　逆遺伝学的手法による葉緑体遺伝子産物の機能解析

タバコ葉緑体ゲノムにコードされる遺伝子のうち，これまでに約 50 種類のノックアウトが報告されている（表 1）．最初にノックアウトされたのは Rubisco の大サブユニットをコードする *rbcL* 遺伝子である[41]．原核型 RNA ポリメラーゼのサブユニットをコードする遺伝子をノックアウトした植物では，色素体に mRNA の蓄積が観察されたことから，核コードの別の RNA ポリメラーゼが確かに存在し，色素体遺伝子の転写を行っていることが明らかになった[42,43]．葉緑体 DNA は核ゲノム内にも存在することが知られているが[44]，上記のいずれのノックアウト株においても，核ゲノム内に存在する葉緑体遺伝子のコピーから発現するかもしれないタンパク質が葉緑体で機能するわけではないことも確認された．その後多くの遺伝子がノックアウトの対象となり，*ycf3*，*ycf6*，*ycf9* 遺伝子産物の機能はタバコで初めて明らかになった．このうち *ycf3* 遺伝子は植物において逆遺伝学的手法により機能が明らかになった最初の葉緑体遺伝子である[45]．

光合成の分野で特に重要だったのは，Ndh 複合体に関する研究である[90,91]．ヒトのミトコンドリアの NADH

表 1：これまでにノックアウトの対象となったタバコ葉緑体遺伝子等

光化学系 I	Clp プロテアーゼ
psaJ[46,47]	**clpP1*[73,74]
ycf3[45,48]	アセチル-CoA カルボキシラーゼ
光化学系 II	**accD*[75]
psbA[49]	RNA ポリメラーゼ
psbE[50,51]	*rpoA*[43,48,76]
psbF[50,51]	*rpoB*[42,76]
psbI[52]	*rpoC1*[43,76]
psbJ[50,51,53]	*rpoC2*[43]
psbL[50,51]	リボソーム
psbM[54]	**rpl20*[77]
psbTc[55]	*rpl33*[77]
psbZ（*ycf9*）[56–59]	**rps2*[77]
シトクロム b_6f 複合体	**rps4*[77]
petA[48,60]	**rps14*[78]
petB[60]	**rps18*[79]
petD[60]	tRNA
petG[61]	**trnC*-GCA[80]
petL[61–63]	*trnG*-GCC[81]
petN（*ycf6*）[61,64]	**trnG*-UCC[81]
NDH 複合体	**trnN*-GUU[80]
ndhA[65]	*trnV*-UAC[82,83]
ndhB[66,67]	低分子 RNA
ndhC[65,68,69]	*sprA*[84,85]
ndhF[70]	*ycf* 遺伝子
ndhH[65]	**ycf1*[86]
ndhI[65]	**ycf2*[86]
ndhJ[65,68,69]	*ycf5*（*ccsA*）[87]
ndhK[65,68,69]	*ycf10*（*cemA*）[88]
ATP 合成酵素	複製開始点
atpB operon[71]	*oriA*[89]
Rubisco	**oriB*[89]
rbcL[41,72]	

*は必須と思われる遺伝子．

脱水素酵素のサブユニットに相同なタンパク質をコードすると思われる遺伝子が葉緑体ゲノムに見つかり，シアノバクテリアの *ndhB* 変異株で光化学系 I サイクリック電子伝達が起こらないこと，また，シアノバクテリアと葉緑体の NDH 複合体が類似していたことから，葉緑体においても同様の機能を持つのではないかと考えられていた．そして，葉緑体 NDH 複合体が光化学系 I サイクリック電子伝達に関与することが実証されたのは，葉緑体形質転換により得られた *ndh* 遺伝子欠損株の解析からである[65,66,68]．この他，電子伝達系の複合体に含まれる低分子サブユニットの機能解析にも逆遺伝学的な手法が用いられている．

コピーのすべてを完全にノックアウトできない遺伝子は植物の生存に必須のものと考えられた．ATP 依存型 Clp プロテアーゼの触媒サブユニットの一つをコードする *clpP1* 遺伝子[73]，脂質の生合成に関与する *accD* 遺伝子[75]，リボソームタンパク質遺伝子[77–79] などのハウスキーピング遺伝子などがそれで，このうち *clpP1* 遺伝子については，別の研究によりその仮説の正しさが証明された[74]．また，*ycf1* 遺伝子や *ycf2* 遺伝子の完全なノックアウトは失敗に終わったことから，非常に重要な機能を持つタンパク質をコードしていると考えられた[86]．タバコ BY-2 培養細胞の色素体タンパク質のプロテオミクス解析から，Ycf1 タンパク質と Ycf2 タンパク質が実際に存在することが報告されたが[92]，それらの機能は依然不明である．

相同組換えによる方法とは別に，バクテリオファージ P1 に由来する CRE-*lox* 部位特異的組換えシステムを用いた葉緑体遺伝子のノックアウト法が報告されている[74]．この方法では，2 つの *lox* 配列で標識した葉緑体ゲノム上の領域を，核ゲノムへ導入した葉緑体移行シグナルを持つ CRE リコンビナーゼで切り出すことにより，ノックアウトする方法である（図 4）．この技術には葉緑体形質転換と核形質転換が必要になるが，CRE リコンビナーゼの発現を誘導型にすれば，目的の遺伝子を時期特異的または器官特異的にノックアウトし，その影響を調べることができる．これまで葉緑体以外での色素体遺伝子の機能の解析は進んでいないが，ここで紹介した方法は有用なツールになるかもしれない．ただし，*ycf1* や *ycf2* 遺伝子などは，このシステムを用いてノックアウトできたとしても，致死となる可能性が高いため解析が困難であることが予想される．完全なノックアウトを目指すのではなく，クラミドモナス葉緑体 *clpP* 遺伝子の研究で行われたように発現量を下げるような工夫が必要かもしれない[93]．

6.b.3.3　葉緑体遺伝子の改変

シアノバクテリアやクラミドモナスに比べ，タバコ葉緑体遺伝子に点変異を導入したという報告は非常に少ない．選択マーカーとして用いられた *rrn16* 遺伝子[10] と *rps12* 遺伝子[94] 以外では，*psbF* 遺伝子[95] と *rbcL* 遺伝子[96] に点変異を導入し，その影響を調べた研究があるくらいである．点変異ではないが，*rbcL* 遺伝子[97–99] や *rpoA* 遺伝子[100] を別の生物種由来の遺伝子と置換する形質転換が行われた．いずれの場合にも，タバコ本来の遺伝子産物とは機能的に置き換わらないようである．

これ以外に，葉緑体で機能する複合体を簡便かつ穏和な条件下で単離精製するために，その複合体に含まれるサブユニットにアフィニティー精製タグを付加することが行われた．Suzuki らは，葉緑体 *rpoA* 遺伝子にコードされる RNA ポリメラーゼ α サブユニットの C 末に

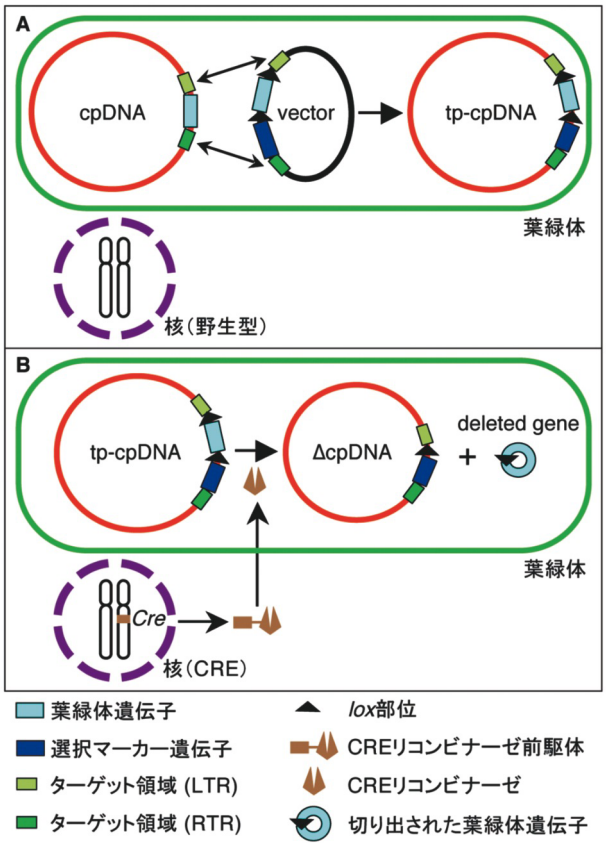

図4：CRE-*lox* 部位特異的組換えシステムを利用した葉緑体遺伝子のノックアウト法．A．まず，葉緑体形質転換により，目的の遺伝子を挟み込むように 2 つの *lox* 部位を導入する．B．その後，核へ CRE リコンビナーゼ遺伝子を導入した核形質転換体（♂）と交配することで，葉緑体形質転換体（♀）へ CRE 遺伝子を導入する．CRE リコンビナーゼは 2 つの *lox* 部位での組換えを引き起こし，そこに挟まれた領域を葉緑体ゲノムから排除する（ΔcpDNA＋deleted gene）．

His-tag を導入し，葉緑体形質転換体から原核型 RNA ポリメラーゼをアフィニティー精製した．そこには σ 因子は含まれていなかったが，コア・サブユニットの他に，機能の不明なタンパク質がいくつか含まれていることを明らかにした[101]．また，最近になって，葉緑体 *psbE* 遺伝子にコードされるシトクロム b_{559} の α サブユニットに His-tag を導入し，光化学系 II をアフィニティー精製する方法が報告された[102]．葉緑体には多くの機能性複合体が存在しているが，その構造や組成はまだ完全に分かっている訳ではない．これまでの精製法では失われていたかもしれないサブユニットが，今後見つかってくるかもしれない．この方法はそのための強力なツールになると考えられる．

6.b.4　実験方法

葉緑体形質転換法は既に様々な文献で詳しく紹介されている[19,38,103]．葉緑体ゲノムを形質転換するためには，形質転換ベクターを葉緑体中へ導入しなければならない．そのための方法がいくつか報告されているが，パーティクルガンを用いて形質転換ベクターを細胞へ撃ち込むパーティクルデリバリー法が一般的である．この方法では，葉緑体形質転換ベクターでコーティングしたマイクロキャリア（タングステンまたは金粒子）を，ヘリウムガスを利用した空気銃の要領で，緑葉へ撃ち込み，葉緑体中へ形質転換ベクターを導入する（図 5）．

パーティクルデリバリー法以外には，ポリエチレングリコールを用いてプロトプラスト化した細胞へ形質転換ベクターを導入する方法[84]や顕微鏡下で形質転換ベク

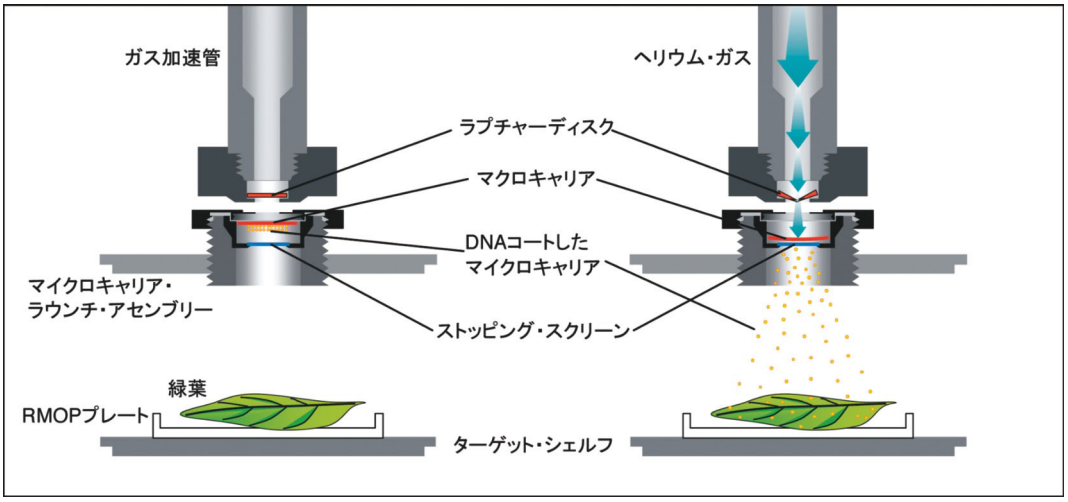

図5：パーティクルデリバリー法による葉緑体への形質転換ベクターの導入．ヘリウムガスを利用した遺伝子導入装置を用いて，ベクターDNA でコーティングしたマイクロキャリアを緑葉へ向けて撃ち込む．バイオ・ラッド・ラボラトリーズ社のご好意により提供していただいた図を改変した．

ターを葉緑体へ注入するマイクロインジェクションという方法がある[104]．前者の場合，高価な装置を必要としないが形質転換効率が低いという難点があるため，あまり用いられない[84]．後者の場合，この方法で導入されたDNAが葉緑体ゲノムへ組み込まれた安定な葉緑体形質転換体は得られていない[104]．本プロトコールではパーティクルガンを用いた葉緑体形質転換法を紹介する．

6.b.4.1　葉緑体形質転換ベクター

葉緑体形質転換ベクターの基本形は，大腸菌で増やすための複製オリジンとアンピシリンなどに耐性を与える選択マーカー遺伝子を持ち，葉緑体DNA上のターゲット領域と葉緑体形質転換のための選択マーカー遺伝子を持つことである．ベクター・バックボーンとして，pUCベクターやpBluescriptベクターが用いられる．

6.b.4.1.1　遺伝子発現を研究するためのベクター

葉緑体遺伝子発現系の研究のために，これまで多くのレポーター遺伝子を用いた研究が行われている．レポーター遺伝子としては，β グルクロニダーゼ(GUS)をコードする *uidA* 遺伝子やGFPなどの蛍光タンパク質をコードする遺伝子が用いられる[19]．レポーター遺伝子を挿入する場所の選択は非常に重要であり，レポーター遺伝子につないだ発現調節領域以外から転写が起こるような場所は避けるべきである．その目的に最も適していると考えられるのは，*trnV*-GAC遺伝子と3'*rps12*遺伝子の間の領域である[105]．この位置に挿入しても周囲の遺伝子発現の影響を受けにくい．一方，*rbcL* 遺伝子と *accD* 遺伝子間にレポーター遺伝子を挿入した場合，レポーター遺伝子は自身のプロモーターからだけではなく，*rbcL* プロモーターからも転写される．そのためにレポーター遺伝子につないだ制御配列に依存しない発現が起こるため，この目的には適していない[21]．

6.b.4.1.2　外来遺伝子発現のためのベクター

医学的に重要な組換えタンパク質，除草剤や害虫に抵抗性を与えるタンパク質，代謝系を改変するようなタンパク質を葉緑体で合成する目的で，葉緑体ゲノムへの外来遺伝子の導入が行われている[19,38–40]．これまで葉緑体ゲノム上の様々な位置への挿入が報告されており，レビューにもまとめられている[38,39]．大きいものでは，約50 kbのDNAの挿入が報告されている[106]．多くの場合，フィールドへ出すことが前提になっているため，選択マーカー遺伝子を除いた形質転換体を作る動きが出ている．そのため，形質転換後にマーカー遺伝子を取り除くための方法がいくつか報告されている[82,107]．また，異常な表現型を持つ Δ*ycf3*，Δ*petA*，Δ*rpoA* 株へ形質転換することで，マーカー遺伝子を持たない葉緑体形質転換体を得る方法も報告されている[48]．この方法では，相同組換えにより正常な遺伝子を導入することで，正常な表現型をもつ植物体になることを形質転換成功の指標としている．

6.b.4.1.3　葉緑体遺伝子をノックアウトするためのベクター

特定の葉緑体遺伝子をノックアウトする場合，葉緑体ゲノム配列を基にノックアウトする領域とターゲット領域を決める．大抵の場合，ノックアウトしたい遺伝子の代わりに選択マーカー遺伝子を挿入したベクターを構築する．この場合にも，効率の良い相同組換えのためには，ターゲット領域は左右それぞれ少なくとも1 kbあることが望ましい．また，マーカー遺伝子の挿入場所と向きは，周辺の遺伝子発現に影響を及ぼさないように決めなければならない．

6.b.4.1.4　葉緑体遺伝子へ変異や精製タグを導入するためのベクター

変異を導入したい遺伝子が決まったら，まず，葉緑体ゲノム配列を基にターゲット領域を決める．次に，選択マーカー遺伝子の挿入場所を決める．ベクターの設計の際の注意点は，ノックアウトのときと同様である．変異を導入する部位がマーカー遺伝子から離れている場合，マーカー遺伝子だけが導入され，目的の変異が導入されないことがある．ターゲット領域内ではどの領域でも相同組換えが起こる可能性があるためで[94,108]，なるべくたくさんの形質転換体を得て，目的の変異が導入された個体を選ぶ必要がある．また，変異を導入する際に，その周辺の塩基配列に新しい制限酵素切断部位ができるように設計すれば，形質転換体を得た時にサザン解析で野生株と区別しやすくなる[96]．

目的のタンパク質にアフィニティー精製のためのタグを導入する場合，C末側に付加した方がよいと思われる．N末側へ導入すると翻訳開始効率が低下し，結果として目的のタンパク質の蓄積量に影響を及ぼす可能性があるためである．また，Rubisco大サブユニットにHis-tagを導入した葉緑体形質転換体の亜鉛含有量が増加したという報告がある[109]．His-tagの導入が代謝系に影響を及ぼす可能性は否定できない．したがって，目的に応じて別のタグの使用も考慮に入れる必要がある[110]．

6.b.4.1.5　選択マーカー遺伝子と阻害剤

葉緑体形質転換体を得るためには，植物の再分化の際に何らかの手段を用いて選択圧をかける必要がある．通常用いられるのは，葉緑体遺伝子発現を阻害する抗生物質である．植物の代謝経路に影響を及ぼす除草剤も使用例がある．表2，表3に，これまでに報告されているタバ

表2：選択マーカー遺伝子と阻害剤

選択マーカー遺伝子	阻害剤
rrn16（点変異）[11]	スペクチノマイシン／ストレプトマイシン
aadA[11]	スペクチノマイシン／ストレプトマイシン
nptII[111]	カナマイシン
aphA-6[112]	カナマイシン
BADH[113]	ベタイン・アルデヒド

コ葉緑体形質転換に用いられた選択マーカーと阻害剤を示す．

タバコ葉緑体形質転換に用いられた最初の選択マーカーは，スペクチノマイシン（およびストレプトマイシン）に耐性を与える変異を導入した *rrn16* 遺伝子である[10]．スペクチノマイシンは葉緑体の30 Sリボソームに結合し，ペプチド転移反応を阻害するため，スペクチノマイシン存在下では植物は生長できない．この選択マーカーを用いた場合，形質転換が可能なゲノム上の位置が限定される．Carrer らにより報告された2種類の異なる形質転換ベクターを同時に導入する方法[114]に利用できるかもしれないが，一般的には抗生物質を不活性化することで耐性を与える選択マーカーを用いる．

現在最もよく用いられている選択マーカーは *aadA* 遺伝子である．この遺伝子産物であるアミノグリコシド-3″-アセチル転移酵素は抗生物質ストレプトマイシンとスペクチノマイシンを不活性化する．そのため，*aadA* 遺伝子の導入された植物細胞はスペクチノマイシンを含む再分化培地で耐性を示し，葉緑体形質転換体を選抜することができる[11]．また，緑色蛍光タンパク質をコードする *gfp* 遺伝子と *aadA* 遺伝子を融合させた Flare-S（Fluorescent antiboitic resistance gene-Spectinomycin）を用いて得られた葉緑体形質転換体では，GFP の蛍光を追跡することで，形質転換した細胞とそうでない細胞が分離する過程を観察することができる[115]．

カナマイシンに対する耐性を与える *nptII* 遺伝子を利用した葉緑体形質転換も報告されている[111,116]．カナマイシンは翻訳開始阻害剤であり，*nptII* 遺伝子産物であるネオマイシンホスホトランスフェラーゼII（NPTII）がカナマイシンを不活性化するため，選択培地上では形質転換した細胞のみ増殖できる．また，*nptII* 遺伝子とは別に，カナマイシンなどのアミノグリコシド系の抗生物質に耐性を与える *aphA-6* 遺伝子の使用も報告されている[112]．この遺伝子産物であるアミノグリコシド・ホスホトランスフェラーゼは NPTII よりも効率よくカナマイシンを不活性化するため，*nptII* 遺伝子を用いたときよりも形質転換効率が良いようである．ただし，カナマイシンには副作用があるらしく，*nptII* 遺伝子の発現量を増やしても形質転換効率はあまり高くならない．*nptII* 遺伝子や *aphA-6* 遺伝子により不活性化できる副作用の少ない抗生物質が見つかれば，葉緑体形質転換効率が高くなるかもしれない．

抗生物質を必要としない選択マーカーとして，BADH 遺伝子が報告されている[113]．この遺伝子産物であるベタイン・アルデヒド脱水素酵素は，毒性のあるベタイン・アルデヒドを不活性化するため，この薬剤を含む選択培地で葉緑体形質転換体が選抜される．スペクチノマイシンを用いたときよりも形質転換効率が高いらしい．

この他に，グリホサートに耐性を与える EPSPS 遺伝子，ビアラフォスに耐性を与える *bar* 遺伝子やピリミジニルカルボキシ系除草剤に耐性を与える変異型 ALS 遺伝子などを導入した葉緑体形質転換体は薬剤耐性を示すが[117–119]，これらの遺伝子を選択マーカーとして使って葉緑体形質転換体を得たという報告は今のところない．

植物の再分化には長い時間がかかるため，阻害剤は室温で数ヶ月間安定でなければならない．また，スペクチノマイシンのような副作用のない（または少ない）阻害剤を用いることが重要である．余談になるが，イネは元々スペクチノマイシンに耐性であり，葉緑体形質転換にスペクチノマイシンによる選抜を行うことができない[115]．スペクチノマイシン感受性のイネ変異株を得られれば，イネ葉緑体形質転換は容易になるかもしれない．

6.b.4.1.6　ベクター構築の際の注意点など

ホモプラストミックな葉緑体形質転換体が得られるまで数ヶ月間を要する．もし，ベクターの設計に問題があったと判明した場合，それまでの労力と時間が無駄になるかもしれない．そのため，ベクターの設計には十分な時間をかけ，念入りに行うべきある．

葉緑体形質転換では相同組換えにより遺伝子を導入するため，基本的には葉緑体ゲノムのどの領域へも形質転換が可能である．ただし，葉緑体遺伝子発現を阻害したり，遺伝子をノックアウトするような部位への挿入は避けるべきである．

選択マーカー遺伝子の発現のために，通常は葉緑体由来のプロモーター，5’ 非翻訳領域，3’ 非翻訳領域を用いる．この時，マーカー遺伝子のコード領域の5’ 側と3’ 側につなげる DNA 配列は同じ遺伝子由来にしない方が良い．たとえその領域短くても，予期せぬ領域で相同組換えが起こったり，葉緑体内在性遺伝子がノックアウトされてしまう可能性がある[11,49]．また，葉緑体由来の5’ 非翻訳領域から発現するマーカー遺伝子を葉緑体ゲノムへ

導入した時，葉緑体内在性遺伝子の発現が阻害される場合があるので，注意が必要である[27,120]．

組換えタンパク質を発現させるためのベクターを構築する過程で，大腸菌が正常に増殖しないことがある．その原因の一つとして考えられるのは，葉緑体と同様に原核型の遺伝子発現系をもつ大腸菌において組換えタンパク質が大量発現してしまうことである．この場合，目的のベクターが構築できなかったり，葉緑体形質転換に用いるDNAの調製が困難になるため，コピー数の少ないベクターをバックボーンとして用いたり，大腸菌を低温（室温以下）で培養するなどの工夫が必要である．また，目的の組換えタンパク質が大腸菌にとって有害な場合があるが，葉緑体において翻訳開始がRNAエディティングに依存する*psbL*遺伝子や*ndhD*遺伝子の5'非翻訳領域を用いることで問題を回避できるかもしれない[107]．大腸菌ではRNAエディティングが起こらないからである．

6.b.5　形質転換に用いるタバコの生育

6.b.5.1　タバコの種類と生育条件

実験用タバコの栽培品種のうち，葉緑体形質転換にはPetit HavanaやXanthiが用いられている．葉緑体形質転換には培養室かグロース・チャンバーで25–26℃で16時間明条件／8時間暗条件下，無菌的に生育させたタバコを用いる．

6.b.5.2　培地

無菌的にタバコを生育する際，RM寒天培地が用いられる．これは，Murashige-Skoog培地に3％ショ糖と0.75％アガーを加えたものである．種子発芽用には40–50 mlの寒天培地を厚めのシャーレに入れたものを用意し，植物育成用には40–50 mlの寒天培地の入ったマジェンタ・ボックスを用意する．アガーの種類やオートクレーブの条件（加温・冷却にかかる時間）により，同じ濃度でも寒天培地の固さが変わる．従って，研究室ごとにアガー濃度を決定する必要がある．通常は0.6–0.8％内に収まるはずである．市販のMurashige-Skoog培地用の粉末を用いても良いが，メーカーごとに品質が異なるようなので注意を要する．もしオートクレーブ後に濁りを生じるならば，その使用は避けた方が良い．

6.b.5.3　種子の殺菌処理およびRM培地への播種

タバコの場合，シードポッド内は無菌のため，殺菌せずに播種する人もいるが，通常はカビやバクテリアの繁殖を抑えるために殺菌処理を行う．作業はクリーンベンチ内で行う．エタノールや次亜塩素酸処理の時間が長すぎると発芽率が大幅に低下するので注意を要する．RM培地への播種後，培養室またはグロース・チャンバーへ置き，2週間ほど生育させる．

表3：10 x macro 水溶液（1,000 ml）

試薬	1,000 mlあたり加える量
KNO_3	19.0 g
$MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$	3.7 g
$CaCl_2 \cdot 2\,H_2O$	4.4 g
KH_2PO_4	1.7 g
$(NH_4)NO_3$	16.5 g

表4：100 x micro 水溶液（100 ml）

試薬	100 mlあたり加える量
$MnSO_4 \cdot 2\,H_2O$	169.0 mg
H_3BO_3	62.0 mg
$ZnSO_4 \cdot 7\,H_2O$	86.0 mg
KI	8.3 mg
$Na_2MoO_4 \cdot 2\,H_2O$（1 mg/ml）	2.5 ml
$CuSO_4 \cdot 5\,H_2O$（1 mg/ml）	0.25 ml
$CoCl_2 \cdot 6\,H_2O$（1 mg/ml）	0.25 ml

表5：RM寒天培地

ストック溶液・試薬	1,000 mlあたり加える量
10 x macro 水溶液	100 ml
100 x micro 水溶液	10 ml
1％ Fe-EDTA（Sigma E6760）	5 ml
ショ糖	30 g
アガー（植物組織培養用）	7.5 g

KOHでpH 5.6–5.8に調整する．
1％ Fe-EDTAは水に溶解後，濾過滅菌し，冷暗所で保存する．

6.b.5.3.1　用意するもの

- 滅菌水：約10 mlをバイアルなどの小さな容器に入れたものを5本程度用意しておくと良い．
- 70％エタノール
- 5％次亜塩素酸／0.1％ Tween 20水溶液
- 滅菌済みのマイクロチューブとピペットマン用のチップ
- 滅菌済みのパスツールピペット（脱脂綿などを詰めてオートクレーブにかける）
- RM寒天培地／10-cmシャーレを数枚
- サージカルテープ．

6.b.5.3.2　殺菌処理の手順

1．1.5 mlのマイクロチューブへ種子を入れる（100〜200個）．
2．70％エタノールを1 ml加え，3分間置く．

3．軽く遠心したあと，上清を捨てる．
4．次亜塩素酸／Tween 20 水溶液を 1 ml 加え，1 分間置く．
5．軽く遠心したあと，上清を捨てる．
6．1 ml の滅菌水 1 ml で 3-5 回洗浄する．
7．最終的に，1 ml の滅菌水に種子を懸濁する．

6.b.5.3.3　播種の手順

1．RM 寒天培地上に滅菌水を 2 ml 程度注ぎ，培地全体に行き渡らせる．
2．殺菌処理した種子を 100 個程度含む懸濁液をパスツールピペットで RM 寒天培地上に載せ，種を培地全体に行き渡らせる．
3．培地上の余分な滅菌水を捨てる（パスツールピペットまたはピペットマンで）．
4．シャーレのふたを閉じ，サージカルテープを巻く．
5．培養室またはグロース・チャンバーへ置き，2 週間ほど生育させる．

6.b.5.4　タバコの植え継ぎと育生

播種後，約 2 週間ほどで RM 寒天培地の入ったマジェンタ・ボックスへ移植できる段階になる（マジェンタ・ボックスはシグマ社から入手可能）．作業はクリーンベンチ内で行う．

6.b.5.4.1　用意するもの

・RM 寒天培地（40-50 ml）/マジェンタ・ボックス GA7
・滅菌済みのピンセット
・サージカルテープ

6.b.5.4.2　手順

1．シャーレで育てた実生をピンセットで傷つけないように採り，マジェンタボックス中の RM 寒天培地に移植する．
2．シャーレのふたをした後，サージカルテープを巻き，培養室で育てる．

6.b.6　葉緑体形質転換

6.b.6.1　RMOP 寒天培地および RMOP/Spec 寒天培地の準備（シューティング前日）

1 種類の形質転換ベクターにつき 20-30 ショット行う．そのために直径 10 cm の薄いバクテリア用プレートに約 10 ml の RMOP 寒天培地を入れたものを 20-30 枚用意する．また，シューティング後の形質転換体の選抜のため，500 μg/ml スペクチノマイシン（塩酸塩）を含む RMOP（RMOP/Spec）寒天培地 40-50 ml を厚めのシャーレに入れたものを 100 枚ほど用意する．滅菌はオートクレーブにより行う．スペクチノマイシンはオートクレーブ後，表 6 の RMOP 培地が 50°C以下に冷めてから加える．

6.b.6.2　葉の準備（シューティング前日）

3-6 週間生長させた植物から緑葉を切り出す．全体が均一に緑色で，なるべく丸い形の葉を用いる．細長い葉は花芽形成が近い状態なので，形質転換には用いない．作業はクリーンベンチ内で行う．

6.b.6.2.1　用意するもの

・滅菌済みのピンセット
・滅菌済みのメス
・滅菌済みの濾紙（直径 10 cm のシャーレに載る大きさのもの）
・RMOP 寒天培地（バクテリア用シャーレに約 10 ml 注ぎ込む）

6.b.6.2.2　手順

1．RMOP 寒天培地上にオートクレーブで滅菌した濾紙を一枚のせ，その上に葉を逆さまにして置く（葉の

表 6：RMOP 寒天培地（必要に応じて抗生物質を加える）

ストック溶液・試薬	1,000 ml あたり加える量
10 x macro 水溶液	100 ml
100 x micro 水溶液	10 ml
1% Fe-EDTA（Sigma E6760）	5 ml
ショ糖	30 g
1 mg/ml thiamine	1 ml
1 mg/ml NAA*（0.1 M NaOH に溶解）	0.1 ml
1 mg/ml BAP**（0.1 M HCl に溶解）	1 ml
Myo-inositol	0.1 g
アガー（植物組織培養用）	7.5 g
100 mg/ml スペクチノマイシン，塩酸塩	500 μl
100 mg/ml ストレプトマイシン，硫酸塩	500 μl

KOH で pH 5.6-5.8 に調整する．
*NAA：1-Naphthaleneacetic acid（ナフタレン酢酸；オーキシン）
**BAP：N6-Benzylamino purine（ベンジルアミノプリン；サイトカイニン）

表側が濾紙に接するように置く).

2．濾紙の上に葉をのせ，葉脈などに切れ目を入れ，葉全体が培地に触れるようにする．葉に切れ目を入れるのを躊躇してはならない．小さな葉を用いる場合，1シャーレあたり2-3枚の葉をのせても構わない.なお，濾紙はシューティング時に寒天培地が飛び散らないようにするためのものである．

3．シャーレのふたを閉じる．サージカルテープを巻く必要はない．

4．必要な枚数用意できたら，シャーレの入っていた無菌のビニール製のバッグに入れ,培養室に置いておく．

6.b.6.3　マイクロキャリア（タングステンまたは金粒子）の準備（シューティング前日）

形質転換ベクターを葉緑体へ導入するためのマイクロキャリアとして，タングステン粒子（直径1.1 μm）または金粒子（直径0.6 μm）が用いられている．最近では高価ではあるが金粒子の使用が主流になっている．マイクロキャリアを洗浄する作業はクリーンベンチ内で行う．なお，この作業はシューティング当日に行っても構わない．

6.b.6.3.1　用意するもの

・マイクロキャリア
・スクリューキャップ付きのマイクロチューブ
・無水エタノール
・滅菌水
・ソニケーター
・超音波処理のための容器（微量超遠心用の厚手のポリプロピレンチューブなど）

6.b.6.3.2　手順

1．100ショットあたり50 mgのマイクロキャリアを用意する．

2．1.5-mlのマイクロチューブへ入れ,無水エタノールを1 ml加える．

3．95℃で2時間処理し,マイクロキャリアを洗浄する．

4．軽く遠心し，マイクロキャリアを沈殿させる．

5．上清を捨て，沈殿を無水エタノールに懸濁する．

6．適当な容器へ移し，超音波処理を施す．5分間の処理を3回行う．

7．超音波処理後，マイクロキャリア懸濁液を1.5-mlのマイクロチューブへ移す．

8．軽く遠心する．

9．上清を捨て，沈殿を滅菌水1 mlに懸濁する．この作業を3回繰り返す．

10．沈殿を1 mlの滅菌水に懸濁する．

11．フリーザーで冷凍保存する（シューティング前日に用意する場合のみ）．

6.b.6.4　マイクロキャリアのDNAコーティング（シューティング当日）

形質転換ベクターDNAでマイクロキャリアをコーティングする．1ショットあたり5 μlのDNAコートしたマイクロキャリア懸濁液が必要である．$CaCl_2$とスペルミジン存在下でマイクロキャリアをコーティングした後，無水エタノールで洗浄する．無水エタノールを用いることで，DNAコートしたマイクロキャリアがサラサラな状態になり，マクロキャリアに載せたときにきれいに均一に広がる．マイクロチューブ内でサラサラな状態になるまで無水エタノールでの洗浄を繰り返す．

6.b.6.4.1　用意するもの

・洗浄済みのマイクロキャリア懸濁液
・形質転換ベクターDNA（$T_{10}E_1$緩衝液に溶解し，濃度は1 μg/μl以上）
・2.5 M $CaCl_2$
・0.1 Mスペルミジン（free base）
・無水エタノール
・マイクロチューブ

6.b.6.4.2　手順

1．1.5-mlのマイクロチューブを氷上に置き,以下のものを順に混合する（6ショット分）.

マイクロキャリア懸濁液	50 μl
形質転換ベクターDNA	10 μg
2.5 M $CaCl_2$	50 μl
0.1 M　スペルミジン（free base）	20 μl

2．低温室で30分間ボルテックスミキサーにかける．

3．200 μlの無水エタノールを加え，よく混ぜる．

4．軽く遠心にかける．

5．上清を除き，沈殿を200 μlの無水エタノールによく懸濁する．

6．軽く遠心にかける．

7．5-6の操作を少なくとも3回繰り返す．

8．最終的に沈殿を30 μlの無水エタノールに懸濁する．

6.b.6.5　パーティクルデリバリー（シューティング）

遺伝子導入装置PDS-1000/He（図6）をクリーンベンチ内に設置する．そのため，作業はクリーンベンチ内で行うことになる．

6.b.6.5.1　装置など

・Bio-Rad PDS-1000/Heシステム
・真空ポンプ
・ヘリウム・ガス・ボンベ
・クリーンベンチ

図 6：遺伝子導入装置 PDS-1000/He. 写真はバイオ・ラッド・ラボラトリーズ社のご好意により提供していただいた.

6.b.6.5.2　1 ショット当たり必要なもの

- ラプチャーディスク 1,100 psi　1 枚
- マクロキャリア　1 枚
- ストッピングスクリーン　1 枚
- マクロキャリアホルダー　1 個

これらを無水エタノールで滅菌し，クリーンベンチ内で乾燥させる．滅菌済みのシャーレ上で行うとよい．また，PDS-1000/He の真空チャンバー内を 70%エタノールで消毒し，乾燥させる．葉緑体形質転換においては，カビが大敵である．植物の再分化には 3 週間以上を要するが，その間無菌状態が保たれていなければならない．従って，非常に清潔な環境で作業を行わなう必要がある．機器の詳しい取り扱い方についてはその取扱説明書を参照のこと．

6.b.6.5.3　手順

1．遺伝子導入装置 PDS-1000/He のメインスイッチを入れる．
2．付属の真空ポンプのスイッチを入れる．
3．ヘリウム・ガス・ボンベのバルブを開く．この時，圧力が少なくとも 1,300 psi 以上でなければならない．
4．マクロキャリアホルダーを 5 枚を用意し，それぞれにマクロキャリアを装着する（滅菌済みのシャーレ上で行うとよい）．
5．DNA コートしたマイクロキャリアをよく懸濁する．マクロキャリア 1 枚当たり 5 μl をアプライし，乾燥させる．この時，DNA コートしたマイクロキャリアはマクロキャリア上にきれいに広がるはずである．そうならない場合には，水分を完全に除去できていないということなので，DNA コートしたマイクロキャリアを再度無水エタノールで洗浄する．
6．ラプチャーディスク・ホルダーにラプチャーディスクを装着する．
7．真空チャンバー内にホルダーをしっかりと取り付ける．
8．フライングディスク・ホルダーにストッピングスクリーンをのせ，その上にマクロキャリアホルダーを取り付ける．ステージの位置は上から 1 番下または下から 2 番目のスロットである．
9．葉をのせたシャーレの蓋を外し，ステージにのせる．真空チャンバーの扉を閉める．
10．真空ボタンを入れ，チャンバー内の圧力が少なくとも〝25 inches of Hg〟に達するまで待つ（10 数秒かかる）．
11．シューティングボタンを押し続ける．圧力が 1,100 psi に達したら，ラプチャーディスクが破れ，DNA コートしたマイクロキャリアが発射される．この時点でシューティングボタンを放す．圧力ボタンのセッティングを変え，チャンバー内を真空状態から復帰させる．
12．真空チャンバーからシャーレを取り出し，蓋を被せる．
13．すべての葉をシューティングし終わったら，再び無菌のビニール袋に入れ，培養室またはグロース・チャンバーに 2 日間静置する．時間が経つと，マイクロキャリアが撃ち込まれた部分はメタリック色に見えてくるはずである．

6.b.6.6　再分化培地への移植

シューティング後，2 日間置くことで葉緑体中での *aadA* マーカー遺伝子の発現を促す．シューティング後すぐに再分化培地へ移すと，培地中のスペクチノマイシンが *aadA* 遺伝子の発現を阻害するため，すべての葉緑体がスペクチノマイシンを不活性化できず，植物が再分化できない．作業はクリーンベンチ内で行う．

6.b.6.6.1　用意するもの

- 滅菌済みのピンセット
- 滅菌済みのメス
- RMOP/Spec 寒天培地

6.b.6.6.2　手順

1．シューティングした葉を約 1 cm^2 くらいの大きさに切り分け，RMOP/Spec 寒天培地上に葉の裏側を上に向けて載せる．寒天培地になじむように，しっかりと

押さえつける．プレート一枚当たり 8 片程度にする．
2．しっかりとラッピングし，培養室かグロース・チャンバーに移す．スペクチノマイシン耐性のシュートが出てくるまで待つ．

6.b.7　植物の再分化と葉緑体形質転換体の評価

葉緑体形質転換が成功していれば，3-4 週間ほどで再分化したシュートを見ることが出来る．新しい再分化植物の出現は再分化の開始から 2 ヶ月ほど続く．再分化した植物体の多くは葉緑体形質転換体であるが，*16* 遺伝子への突然変異によるスペクチノマイシン耐性株も出現する．また，導入した DNA が核ゲノムへ組み込まれることもあるため，葉緑体形質転換体を正しく選抜する必要がある．

6.b.7.1　再分化，継代培養，種子形成のアウトライン

1．最初のシュートを切り刻み，新しい RMOP/Spec 寒天培地で再分化を開始する．
2．3-4 週間後，再分化したシュートを切り刻み，新しい RMOP/Spec 寒天培地へ移植する．また，突然変異体と区別するために，RMOP/Spec/Str 寒天培地にも移植する．
3．3-4 週間後，再分化したシュートを RM 寒天培地に移植し，発根させる（シャーレ）．
4．発根し，葉が大きくなったら，葉から DNA を抽出し，サザン解析や PCR 解析を行う．
5．再分化した植物が目的のホモプラストミックな形質転換体であれば，植物をマジェンタ・ボックスの RM 寒天培地に植えかえ，さらに大きく育てる．
6．土壌へ植えかえ，種子を形成させる．

6.b.7.2　抗生物質による葉緑体形質転換体の評価

シューティング後に再分化したシュートが大きくなってきたら，細かく切り分けて，新しい RMOP/Spec 寒天培地に移植する．これと同時に，RMOP/Spec/Str 寒天培地（表 6 を参照）にも移植し，培養する．もし，再分化した植物が目的の葉緑体形質転換体であれば，ストレプトマイシンを含む培地上で緑色のカルスを形成するはずである．*aadA* 遺伝子が導入されたタバコはストレプトマイシンにも耐性となるからである．スペクチノマイシン耐性の 16 S rRNA 変異株はストレプトマイシン耐性とはならない．そのため，葉緑体形質転換体と突然変異体を容易に区別することが出来る．

3 週間ほどすると，多数の新しい再分化したシュートが出現する．今度は細かく切り分けず，茎のところで切り，発根を促すために RM 培地に移植する．サザン解析や PCR 解析を行うため，少なくとも 4 個体を植えつぐ必要がある．

6.b.7.3　サザン解析や PCR 解析による葉緑体形質転換体の評価

シュートが発根し適当な大きさになったら，葉から DNA を抽出し，サザン解析や PCR 解析を行う．これにより，すべての葉緑体 DNA が置き換わっていることを確認する．これらの解析法は広く行われているので，ここでは簡単に触れるにとどめておく．

サザン解析の場合，CTAB 法などにより調製した DNA を適当な制限酵素で切断し，マーカー遺伝子およびターゲット領域に相補的な 2 種類の異なるプローブを用いて別々にハイブリダイゼーションを行う．注意しなければならない点は，ターゲット領域の外側で切断する制限酵素を用いることである（一方が外側で，もう一方が内側でも良い）．ターゲット領域の内側で切断する制限酵素を用いると，ベクターが葉緑体ゲノムのどこに挿入されても同じシグナルが得られてしまうからである．また，野生株と葉緑体形質転換体を明確に区別できるように切断する制限酵素を選択する．

ゲノム解析から，核ゲノムにも葉緑体 DNA が挿入されていることが報告されている．そのため，葉全体から抽出した DNA の解析では，ホモプラストミックな葉緑体形質転換体かどうかの判定が難しいことがある[121]．単離葉緑体から DNA を抽出するか，パルス・フィールド・ゲル電気泳動で葉緑体 DNA を分離してから PCR により検定することで，その問題を回避できる[88]．

6.b.8　継代培養と種子形成

RM 寒天培地の入ったマジェンタ・ボックスへ移し，形質転換体を生育させる．また，土へ植えかえ，種子を形成させる．マジェンタ・ボックスで生育させた植物体を土へ植えかえるとき，根に付着した RM 寒天培地をよく洗い流さなければならない．栄養分を含む培地が残ると，カビやバクテリアが繁殖し，根の発達に悪影響を及ぼすからである．土へ植えかえたあとは，植物をサランラップなどで軽く覆い，数日から一週間くらいは出来るだけ湿度を保つようにする．

6.b.9　交配とシード・アッセイによる葉緑体形質転換体の評価

サザン解析や PCR 解析では，再分化した個体の一部

分しか調べないため，個体全体としてはホモプラストミックな形質転換体となっていない可能性が残っている．また，葉緑体ゲノムだけでなく，核ゲノムへも選択マーカー遺伝子が挿入している可能性もあるため[122]，得られた種子を抗生物質を含む培地上で発芽させることで，ホモプラストミックな葉緑体形質転換体かどうかを判定しなければならない．そのために，自家受粉によりえられる種子とは別に，野生株との交配による種子を得る必要がある．

6.b.9.1　交配方法

6.b.9.1.1　用意するもの

・ピンセット（使用前に 70%エタノールで洗浄する）
・グラシン紙などで作った小さな袋
・付け札

6.b.9.1.2　手順

1．開花直前のつぼみを選び，花の一部にピンセットで切れ目を入れる．
2．つぼみの中の 5 本の雄しべをすべて取り除く．
3．他の個体から採取した花粉を雌しべに塗り付ける．
4．グラシン紙製の袋をかけ，開花後に受粉が起こらないようにする．
5．付け札に，どの組み合わせで交配を行ったかを記入し，花に引っ掛けておく．

6.b.9.2　シード・アッセイ

マーカー遺伝子として *aadA* 遺伝子を用いた場合には，500 μg/ml スペクチノマイシンを含む RM 培地上で，*nptII* を用いた場合には，200 μg/ml カナマイシン（硫酸塩）を含む RM 培地上で発芽させる（表 5 を参照）．抗生物質としてカナマイシンを用いる場合，種子の洗浄に使用する滅菌水にあらかじめ 200 μg/ml カナマイシンを加えておく必要がある．カナマイシンを含む RM 寒天培地上で発芽した時，子葉がグリーンになることがあるからである．ただし，カナマイシンに耐性を示さない場合，本葉は形成されないため，形質転換体と野生株を区別することは可能である．

6.b.9.3　自家受粉により得られた種子の場合

ホモプラストミックな形質転換体を自家受粉させた場合(タバコは基本的に自家受粉する)，得られた種子から発芽した芽生えはすべて RMOP/Spec 寒天培地上でグリーンになるはずである．白い個体があれば，葉緑体形質転換体はホモプラストミックではないということになる．

6.b.9.4　形質転換体（♀）と野生株（♂）の交配により得られた種子の場合

被子植物の葉緑体は基本的に母性遺伝するため，RMOP/Spec 寒天培地上では芽生えはすべてグリーンになるはずである．白い個体が見られるようなら，葉緑体形質転換体はホモプラストミックではないということになる．

6.b.9.5　野生株（♀）と形質転換体（♂）の交配により得られた種子の場合

芽生えはすべて白くなるはずである．もし RMOP/Spec 寒天培地上でグリーンの芽生えが多数見られるようなら，核ゲノムへも *aadA* 遺伝子が挿入した可能性がある．そのような場合には，「形質転換体（♀）と野生株（♂）の交配により得られた種子」の中から核ゲノムにマーカー遺伝子の挿入されていないものを選び出す必要がある．

6.b.10　トラブル・シューティング

再分化培地上で形質転換体が得られない場合，RMOP/Spec 培地などに問題がないかを確認する．抗生物質を含まない培地で野生株からの再分化が起こるかを調べればよい．

葉緑体機能を損ねるような変異を導入することで植物が異常な表現型を示したり，また，組換えタンパク質の大量発現により〝弱い〟形質転換体が得られることがある[123]．再分化した植物を良く観察し，異常な表現型の出現を見逃さないことが重要である（形質転換後，最初に出現した葉をよく見ると，緑と黄緑色の斑模様が観察できることがある．）．

再分化培地上で長期間組織培養を続けると，予期せぬ変異が入ることで植物が異常な表現型を示すことがある[121]．このようなことが起こると，目的の変異の導入による表現型と混同する恐れがある．もし核ゲノムへの変異による異常な表現型であれば，野生株との交配を繰り返すことで，問題を解決できるかもしれない．

雄しべが短すぎて自家受粉ができない形質転換体が得られることがある．このようになると花がぽろぽろと落ち，種子が形成されない．この場合には，野生株の花粉を用いて葉緑体形質転換体と交配させることで，問題を解決できることがある．また，ミトコンドリア DNA への変異のために雄性不稔が起こる可能性がある[124]．タバコなどの種子植物ではミトコンドリアは葉緑体と同様に母性遺伝するため，野生株との交配による正常化はできない．葉緑体ゲノムへの変異による優性不稔の可能性も報告されており[125]，このような変異が入った場合には，修正は不可能と思われる．このような問題が起こらないようにするためには，一つの形質転換について複数の形質

転換体を得て，それぞれを確実に評価することが重要である．

6.b.11 おわりに

タバコ葉緑体形質転換法の確立から約 20 年が経過し，これまでに基礎研究から応用研究まで非常に幅広く利用されてきた．しかしながら，被子植物の葉緑体形質転換は非常に手間がかかり，また，容易に形質転換できる植物種が非常に限られているため，光合成研究にはまだそれほど積極的に用いられていない．現状では，医学的，薬学的，工業的に有用な組換えタンパク質の生産や除草剤や害虫に抵抗性をもつ植物や代謝系を改変した植物を作出するなど応用分野で主に注目されている．

葉緑体形質転換法を用いた逆遺伝学的手法により，葉緑体遺伝子産物の機能が次々に明らかになってきたが，*ycf1*，*ycf2* などいまだに機能不明のものもあり，それらの解明は今後の課題である．もしかすると，非コード RNA[126,127] などの未知の遺伝子がまだ残っているかもしれない．また，クラミドモナスとは異なり，植物には分化した色素体が存在する．しかし，葉緑体以外の色素体でのプラスチド遺伝子の機能に関する研究はあまり進んでいない．葉緑体（色素体）形質転換法は，光合成研究を含めた葉緑体の研究だけでなく，他の色素体の研究にも利用できると思われる．これまでに作出された葉緑体遺伝子ノックアウト株やレポーター遺伝子を導入した形質転換がこの研究に用いられなかったのは非常に残念なことである．

葉緑体コードのサブユニットへ導入したタグを利用して超分子複合体をアフィニティー精製し，そこに新規のタンパク質やこれまでの方法で精製した標品には含まれていなかったサブユニットが確認された[101,102]．このことは，このアプローチの有効性の高さを示すものである．もし，複合体の単離精製の段階で失われたサブユニットがあるとすれば，その標品を用いた構造解析や活性測定に大きく影響を及ぼす可能性がある．今後，他の複合体でも，より生体内での存在状態に近い形で精製するために同様のアプローチが用いられるかもしれない．

実のところ，葉緑体形質転換体の設計と作出は出発点に過ぎず，一定の結論を得るためには様々な手法による形質転換体の詳細な解析が行われなければならない．タバコ葉緑体形質転換法は決して難しい技術ではないが，高価な装置を必要とするため，実際に形質転換を行える研究室は限られている．今後は多くのグループが連携して研究を進めることも必要になってくるであろう．本章で紹介したプロトコールが光合成研究の発展に役立つものとなれば幸いである．

謝辞

葉緑体ゲノム地図を提供していただいた名古屋市立大学の湯川真希，杉浦昌弘両氏および愛知学院大学の續伯彦氏に感謝いたします．また，遺伝子導入装置等の図を提供いただいた際にご協力いただきましたバイオ・ラッド・ラボラトリーズ社の平子俊行氏に厚く御礼申し上げます．

参考文献

1）R. R. Wise, The Structure and Function of Plastids, eds. R. R. Wise, & J. K. Hoober, Dordrecht, Springer, 2006, p.3.
2）K. Shinozaki, M. Ohme, M. Tanaka, T. Wakasugi, N. Hayashida, T. Matsubayashi, N. Zaita, J. Chunwongse, J. Obokata, K. Yamaguchi-Shinozaki, C. Ohto, K. Torazawa, B.-Y. Meng, M. Sugita, H. Deno, T. Kamogashira, K. Yamada, J. Kusuda, F. Takaiwa, A. Kato, N. Tohdoh, H. Shimada, & M. Sugiura, EMBO J. **5** (1986) p.2043.
3）M. Yukawa, T. Tsudzuki, & M. Sugiura, Plant Mol. Biol. Rep. **23** (2005) p.1.
4）K. Ohyama, H. Fukuzawa, T. Kohchi, H. Shirai, T. Sano, S. Sano, K. Umesono, Y. Shiki, M. Takeuchi, Z. Chang, S. Aota, H. Inokuchi, & H. Ozeki, Nature **322** (1986) p.572.
5）J. E. Boynton, N. W. Gillham, E. H. Harris, J. P. Hosler, A. M. Johnson, A. R. Jones, B. L. Randolph-Anderson, D. Robertson, T. M. Klein, K. B. Shark, & J. C. Sanford, Science **240** (1988) p.1534.
6）M. Goldschmidt-Clermont, Nucleic Acids Res. **19** (1991) p.4083.
7）H. Daniell, J. Vivekananda, B. L. Nielsen, G. N. Ye, K. K. Tewari, & J. C. Sanford, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87** (1990) p.88.
8）G. N. Ye, H. Daniell, & J. C. Sanford, Plant Mol. Biol. **15** (1990) p.809.
9）J. M. Shaver, D. J. Oldenburg, & A. J. Bendich, Planta **224** (2006) p.72.
10）Z. Svab, P. Hajdukiewicz, & P. Maliga, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87** (1990) p.8526.
11）Z. Svab, & P. Maliga, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90** (1993) p.913.
12）S. Ruf, M. Hermann, I. J. Berger, H. Carrer, & R. Bock, Nat. Biotechnol. **19** (2001) p.870.
13）B. K. Hou, Y. H. Zhou, L. H. Wan, Z. L. Zhang, G. F. Shen, Z. H. Chen, & Z. M. Hu, Transgenic Res. **12**

(2003) p.111.
14) S. umar, A. Dhingra, & H. Daniell, Plant Physiol. **136** (2004) p.2843.
15) N. Dufourmantel, B. Pelissier, F. Garcon, G. Peltier, J.-M. Ferullo, & G. Tissot, Plant Mol. Biol. **55** (2004) p. 479.
16) C. L. C. Lelivelt, M. S. McCabe, C. A. Newell, C. B. de Snoo, K. M. P. van Dun, I. Birch-Machin, J. C. Gray, K. H. G. Mills, & J. M. Nugent, Plant Mol. Biol. **58** (2005) p.763.
17) S. Okumura, M. Sawada, Y. W. Park, T. Hayashi, M. Shimamura, H. Takase, & K. Tomizawa, Transgenic Res. **15** (2006) p.637.
18) S. Kumar, A. Dhingra, & H. Daniell, Plant Mol. Biol. **56** (2004) p.203.
19) H.-U. Koop, S. Herz, T. J. Golds, & J. Nickelsen, Cell and Molecular Biology of Plastids, ed. R. Bock, Berlin/Heidelberg, Springer, 2007, p.457.
20) J. M. Staub, & P. Maliga, EMBO J. **12** (1993) p.601.
21) J. M. Staub, & P. Maliga, Plant J. **6** (1994) p.547.
22) L. A. Allison, & P. Maliga, EMBO J. **14** (1995) p.3721.
23) P. Sriraman, D. Silhavy, & P. Maliga, Nucleic Acids Res. **26** (1998) p.4874.
24) J. Y. Suzuki, P. Sriraman, Z. Svab, & P. Maliga, Plant Cell **15** (2003) p.195.
25) F. Zhou, D. Karcher, & R. Bock, Plant J. **52** (2007) p. 961.
26) R. Bock, & P. Maliga, Nucleic Acids Res. **23** (1995) p. 2544.
27) S. Chaudhuri, H. Carrer, & P. Maliga, EMBO J. **14** (1995) p.2951.
28) S. Chaudhuri, & P. Maliga, EMBO J. **15** (1996) p.5958.
29) R. Bock, M. Hermann, & H. Kössel, EMBO J. **15** (1996) p.5052.
30) M. L. Reed, & M. R. Hanson, Mol. Cell. Biol. **17** (1997) p.6948.
31) M. Hermann, & R. Bock, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96** (1999) p.4856.
32) M. L. Reed, N. M. Peeters, & M. R. Hanson, Nucleic Acids Res. **29** (2001) p.1507.
33) T. Shiina, L. Allison, & P. Maliga, Plant Cell **10** (1998) p.1713.
34) C. Eibl, Z. Zou, A. Beck, M. Kim, J. Mullet, & H.-U. Koop, Plant J. **19** (1999) p.333.
35) H. Kuroda, & P. Maliga, Plant Physiol. **125** (2001) p. 430.
36) K. Wostrikoff, & D. Stern, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **104** (2007) p.6466.
37) T. Shikanai, Cell. Mol. Life Sci. **63** (2006) p.698.
38) P. Maliga, Annu. Rev. Plant Biol. **55** (2004) p.289.
39) K. A. Lutz, A. K. Azhagiri, T. Tungsuchat-Huang, & P. Maliga, Plant Physiol. **145** (2007) p.1201.
40) D. Verma, & H. Daniell, Plant Physiol. **145** (2007) p. 1129.
41) I. Kanevski, & P. Maliga, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91** (1994) p.1969.
42) L. A. Allison, L. D. Simon, & P. Maliga, EMBO J. **15** (1996) p.2802.
43) G. Serino, & P. Maliga, Plant Physiol. **117** (1998) p. 1165.
44) M. A. Ayliffe, N. S. Scott, & J. N. Timmis, Mol. Biol. Evol. **15** (1998) p.738.
45) S. Ruf, H. Kössel, & R. Bock, J. Cell Biol. **139** (1997) p. 95.
46) A. Hansson, K. Amann, A. Zygadlo, J. Meurer, H. V. Scheller, & P. E. Jensen, FEBS J. **274** (2007) p.1734.
47) M. A. Schöttler, C. Flügel, W. Thiele, S. Stegemann, & R. Bock, Biochem. J. **403** (2007) p.251.
48) S. M. J. Klaus, F.-C. Huang, C. Eibl, H.-U. Koop, & T. J. Golds, Plant J. **35** (2003) p.811.
49) E. Baena-González, Y. Allahverdiyeva, Z. Svab, P. Maliga, E.-M. Josse, P. Mäenpää, & E.-M. Aro, Plant J. **35** (2003) p.704.
50) M. Swiatek, R. E. Regel, J. Meurer, G. Wanner, H. B. Pakrasi, I. Ohad, & R. G. Herrmann, Mol. Genet. Genomics **268** (2003) p.699.
51) M. Suorsa, R. E. Regel, V. Paakkarinen, N. Battchikova, R. G. Herrmann, & E.-M. Aro, Eur. J. Biochem. **271** (2004) p.96.
52) S. Schwenkert, P. Umate, C. Dal Bosco, S. Volz, L. Mlcochova, M. Zoryan, L. A. Eichacker, I. Ohad, R. G. Herrmann, & J. Meurer, J. Biol. Chem. **281** (2006) p. 34227.
53) M. Hager, M. Hermann, K. Biehler, A. Krieger-Liszkay, & R. Bock, J. Biol. Chem. **277** (2002) p.14031.
54) P. Umate, S. Schwenkert, I. Karbat, C. Dal Bosco, L. Mlčochová, S. Volz, H. Zer, R. G. Herrmann, I. Ohad, & J. Meurer, J. Biol. Chem. **282** (2007) p.9758.
55) P. Umate, C. Fellerer, S. Schwenkert, M. Zoryan, L. A. Eichacker, A. Sadanandam, I. Ohad, R. G. Herrmann, & J. Meurer, Plant Physiol. **148** (2008) p.1342.
56) P. Mäenpää, E. B. Gonzalez, M. S. Khan, J. C. Gray, & E.-M. Aro, J. Exp. Bot. **51** (2000) p.375.
57) S. Ruf, K. Biehler, & R. Bock, J. Cell Biol. **149** (2000) p.369.
58) E. Baena-González, J. C. Gray, E. Tyystjärvi, E.-M. Aro, & P. Mäenpää, J. Biol. Chem. **276** (2001) p.20795.
59) M. Swiatek, R. Kuras, A. Sokolenko, D. Higgs, J. Olive, G. Cinque, B. Müller, L. A. Eichacker, D. B. Stern, R. Bassi, R. G. Herrmann, & F.-A. Wollman, Plant Cell **13** (2001) p.1347.
60) R.-A. Monde, F. Zito, J. Olive, F.-A. Wollman, & D. B. Stern, Plant J. **21** (2000) p.61.
61) S. Schwenkert, J. Legen, T. Takami, T. Shikanai, R.

G. Herrmann, & J. Meurer, Plant Physiol. **144** (2007) p. 1924.
62) A. Fiebig, S. Stegemann, & R. Bock, Nucleic Acids Res. **32** (2004) p.3615.
63) M. A. Schöttler, C. Flugel, W. Thiele, & R. Bock, J. Biol. Chem. **282** (2007) p.976.
64) M. Hager, K. Biehler, J. Illerhaus, S. Ruf, & R. Bock, EMBO J. **18** (1999) p.5834.
65) W. Kofer, H.-U. Koop, G. Wanner, & K. Steinmüller, Mol. Gen. Genet. **258** (1998) p.166.
66) T. Shikanai, T. Endo, T. Hashimoto, Y. Yamada, K. Asada, & A. Yokota, *Proc*. Natl. Acad. Sci. USA **95** (1998) p.9705.
67) E. M. Horváth, S. O. Peter, T. Joët, D. Rumeau, L. Cournac, G. V. Horvath, T. A. Kavanagh, C. Schäfer, G. Peltier, & P. Medgyesy, Plant Physiol. **123** (2000) p. 1337.
68) P. A. Burrows, L. A. Sazanov, Z. Svab, P. Maliga, & P. J. Nixon, EMBO J. **17** (1998) p.868.
69) A. Takabayashi, T. Endo, T. Shikanai, & F. Sato, Biosci. Biotechnol. Biochem. **66** (2002) p.2107.
70) M. Martín, L. M. Casano, J. M. Zapata, A. Guéra, E. M. del Campo, C. Schmitz-Linneweber, R. M. Maier, & B. Sabater, Physiol. Plant. **122** (2004) p.443.
71) D. Karcher, & R. Bock, J. Biol. Chem. **277** (2002) p. 5570.
72) V. Kode, E. A. Mudd, S. Iamtham, & A. Day, Plant J. **46** (2006) p.901.
73) T. Shikanai, K. Shimizu, K. Ueda, Y. Nishimura, T. Kuroiwa, & T. Hashimoto, Plant Cell Physiol. **42** (2001) p.264.
74) H. Kuroda, & P. Maliga, Nature **425** (2003) p.86.
75) V. Kode, E. A. Mudd, S. Iamtham, & A. Day, Plant J. **44** (2005) p.237.
76) G. De Santis-Mociossek, W. Kofer, A. Bock, S. Schoch, R. M. Maiewr, G. Wanner, W. Rüdiger, H. U. Koop, & R. G. Herrrmann, Plant J. **18** (1999) p.477.
77) M. Rogalski, M. A. Schottler, W. Thiele, W. X. Schulze, & R. Bock, Plant Cell **20** (2008) p.2221.
78) D. Ahlert, S. Ruf, & R. Bock, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **100** (2003) p.15730.
79) M. Rogalski, S. Ruf, & R. Bock, Nucleic Acids Res. **34** (2006) p.4537.
80) J. Legen, G. Wanner, R. G. Herrmann, I. Small, & C. Schmitz-Linneweber, Plant J. **51** (2007) p.751.
81) M. Rogalski, D. Karcher, & R. Bock, Nat. Struct. Mol. Biol. **15** (2008) p.192.
82) S. Corneille, K. Lutz, Z. Svab, & P. Maliga, Plant J. **27** (2001) p.171.
83) P. T. J. Hajdukiewicz, L. Gilbertson, & J. M. Staub, Plant J. **27** (2001) p.161.
84) H.-U. Koop, K. Steinmüller, H. Wagner, C. Rössler, C. Eibl, & L. Sacher, Planta **199** (1996) p.193.
85) M. Sugita, Z. Svab, P. Maliga, & M. Sugiura, Mol. Gen. Genet. **257** (1997) p.23.
86) A. Drescher, S. Ruf, T. Calsa, H. Carrer, & R. Bock, Plant J. **22** (2000) p.97.
87) K. Tsuruya, M. Suzuki, W. Plader, C. Sugita, & M. Sugita, Acta Physiol. Plant. **28** (2006) p.365.
88) M. Swiatek, S. Greiner, S. Kemp, A. Drescher, H.-U. Koop, R. G. Herrmann, & R. M. Maier, Curr. Genet. **43** (2003) p.45.
89) S. K. Mühlbauer, A. Lössl, L. Tzekova, Z. Zou, & H.-U. Koop, Plant J. **32** (2002) p.175.
90) T. Shikanai, Annu. Rev. Plant Biol. **58** (2007) p.199.
91) T. Endo, S. Ishida, N. Ishikawa, & F. Sato, Mol. Cells **25** (2008) p.158.
92) S. Baginsky, A. Siddique, & W. Gruissem, J. Proteome Res. **3** (2004) p.1128.
93) W. Majeran, F. A. Wollman, & O. Vallon, Plant Cell **12** (2000) p.137.
94) J. M. Staub, & P. Maliga, Plant Cell **4** (1992) p.39.
95) R. Bock, H. Kössel, & P. Maliga, EMBO J. **13** (1994) p.4623.
96) S. M. Whitney, S. von Caemmerer, G. S. Hudson, & T. J. Andrews, Plant Physiol. **121** (1999) p.579.
97) I. Kanevski, P. Maliga, D. F. Rhoades, & S. Gutteridge, Plant Physiol. **119** (1999) p.133.
98) S. M. Whitney, & T. J. Andrews, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98** (2001) p.14738.
99) R. E. Sharwood, S. von Caemmerer, P. Maliga, & S. M. Whitney, Plant Physiol. **146** (2008) p.83.
100) J. Y. Suzuki, & P. Maliga, Curr. Genet. **38** (2000) p. 218.
101) J. Y. Suzuki, A. J. Ytterberg, T. A. Beardslee, L. A. Allison, K. J. van Wijk, & P. Maliga, Plant J. **40** (2004) p.164.
102) H. Fey, D. Piano, R. Horn, D. Fischer, M. Schmidt, S. Ruf, W. P. Schroder, R. Bock, & C. Buchel, Biochim. Biophys. Acta **1777** (2008) p.1501.
103) R. Bock, RNA Interference, editing, and Modification, ed. J. M. Gott, Totowa, Humana Press, 2004, p.345.
104) M. Knoblauch, J. M. Hibberd, J. C. Gray, & A. J. E. Van Bel, Nat. Biotechnol. **17** (1999) p.906.
105) O. V. Zoubenko, L. A. Allison, Z. Svab, & P. Maliga, Nucleic Acids Res. **22** (1994) p.3819.
106) T. Adachi, H. Takase, & K. Tomizawa, Biosci. Biotechnol. Biochem. **71** (2007) p.2266.
107) K. A. Lutz, M. H. Bosacchi, & P. Maliga, Plant J. **45** (2006) p.447.
108) T. A. Kavanagh, N. D. Thanh, N. T. Lao, N. McGrath, S. O. Peter, E. M. Horváth, P. J. Dix, & P. Medgyesy, Genetics **152** (1999) p.1111.
109) D. Rumeau, N. Becuwe-Linka, A. Beyly, P. Carrier, S.

Cuine, B. Genty, P. Medgyesy, E. Horvath, & G. Peltier, Plant Biotechnol. J. **2** (2004) p.389.
110) K. Terpe, *Appl. Microbiol*. Biotechnol. **60** (2003) p.523.
111) H. Carrer, T. N. Hockenberry, Z. Svab, & P. Maliga, Mol. Gen. Genet. **241** (1993) p.49.
112) F.-C. Huang, S. M. Klaus, S. Herz, Z. Zou, H.-U. Koop, & T. J. Golds, Mol. Genet. Genomics **268** (2002) p. 19.
113) H. Daniell, B. Muthukumar, & S. B. Lee, *Curr. Genet*. **39** (2001) p.109.
114) H. Carrer, & P. Maliga, Biotechnology **13** (1995) p. 791.
115) M. S. Khan, & P. Maliga, Nat. Biotechnol. **17** (1999) p. 910.
116) K. A. Lutz, S. Corneille, A. Azhagiri, Z. Svab, & P. Maliga, Plant J. **37** (2004) p.906.
117) H. Daniell, R. Datta, S. Varma, S. Gray, & S. B. Lee, Nat. Biotechnol. **16** (1998) p.345.
118) K. A. Lutz, J. E. Knapp, & P. Maliga, Plant Physiol. **125** (2001) p.1585.
119) M. Shimizu, M. Goto, M. Hanai, T. Shimizu, N. Izawa, H. Kanamoto, K. Tomizawa, A. Yokota, & H. Kobayashi, Plant Physiol. **147** (2008) p.1976.
120) H. Kuroda, & P. Maliga, Plant Physiol. **129** (2002) p. 1600.
121) P. Maliga, & P. J. Nixon, Trends Plant Sci. **3** (1998) p. 376.
122) G.-N. Ye, S.-Z. Pang, & J. C. Sanford, Plant Cell Rep. **15** (1996) p.479.
123) J. S. Tregoning, P. Nixon, H. Kuroda, Z. Svab, S. Clare, F. Bowe, N. Fairweather, J. Ytterberg, K. J. van Wijk, G. Dougan, & P. Maliga, Nucleic Acids Res. **31** (2003) p.1174.
124) C. A. Conley, & M. R. Hanson, J. Bioenerg. Biomembr. **27** (1995) p.447.
125) Z. Chen, K. F. Schertz, J. E. Mullet, A. DuBell, & G. E. Hart, Plant Mol. Biol. **28** (1995) p.799.
126) C. Marker, A. Zemann, T. Terhörst, M. Kiefmann, J. P. Kastenmayer, P. Green, J.-P. Bachellerie, J. Brosius, & A. Hüttenhofer, Curr. Biol. **12** (2002) p.2002.
127) B. Lung, A. Zemann, M. J. Madej, M. Schuelke, S. Techritz, S. Ruf, R. Bock, & A. Huttenhofer, Nucleic Acids Res. **34** (2006) p.3842.